

## HiPure Total RNA Plus Kit

总 RNA 双柱带酶试剂盒（通用）

### 产品简介

本产品适合于从 $\leq 5 \times 10^6$ 个培养细胞、 $\leq 20\text{mg}$ 动物组织样品中提取总RNA，包括小分子miRNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术和膜上DNA酶消化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，整个提取过程只需30分钟，得到的RNA可直接用于RT-PCR、Northern Blot、Poly A纯化，核酸保护和体外翻译等实验。

### 产品组份

产品编号	R4121-01B	R4121-02B	R4121-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
gDNA Filter Mini Column	10	50	250
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	30	150	6 x 100
Proteinase K Solution	0.2 ml	1.2 ml	6.0 ml
DNase I	120 $\mu\text{l}$	600 $\mu\text{l}$	5 x 600 $\mu\text{l}$
DNase Buffer	1.8 ml	6 ml	30 ml
RTL Lysis Buffer	10 ml	30 ml	120 ml
RNA Digestion Buffer	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer RVC*	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml

版本号：202401

### 保存条件

本产品可在室温(15-25°C)保存 18 个月。DNase I 和 Proteinase K 采用室温运输，收到产品

后，把 DNase I/Proteinase K 保存于-20~8℃。

## 准备事项

- 在 Buffer RW2 中，加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 在 Buffer RWC 中，加入 2 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 提升裂解液的变性能力：使用前分装适量的 RTL Lysis Buffer，按每 1ml RTL Lysis Buffer 加入 20 $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇、1M DTT 或 1M TCEP (货号 C175)，混合液室温可保存 1 周。TCEP，中文名为三(2-羧乙基)膦盐酸盐，是一种高效、无异味、不含硫醇基还原剂，可高效灭活核酸酶和防止多酚氧化，可代替 2-巯基乙醇，提高 RNA 的完整性和得率。

## 实验步骤

### A. 细胞类样品：

初次使用时，建议使用  $2 \times 10^6$  个细胞。根据结果再调整细胞量。但不论何种情况，细胞量不要超过  $5 \times 10^6$ 。

#### 1. 加入 RTL Lysis Buffer 至细胞样品中，打散细胞。

**离心收集的细胞：**弹打或涡旋松散细胞沉淀，加入 400 $\mu$ l RTL Lysis Buffer，涡旋或用移液枪吸打打散细胞。

**直接裂解：**彻底吸弃培养液，向培养瓶或培养皿中加入 400 $\mu$ l RTL Lysis Buffer。用移液枪吹打使细胞从壁上脱落，转移至 1.5ml 离心管中。

**全血样品：**取 1ml 新鲜血液样品，用淋巴细胞分离液分离得到白细胞沉淀，弹打松散白细胞沉淀，加入 400 $\mu$ l RTL Lysis Buffer，涡旋或用移液枪吸打打散细胞。

#### 2. 用注射器或移液枪抽打裂解液 3~5 次匀浆样品降低裂解液的粘稠度。

#### 3. 加入 200 $\mu$ l RNA Digestion Buffer 和 20 $\mu$ l Proteinase K，颠倒混匀 6-8 次，室温放置 15 分钟。按第 4 步进行操作。

### B. 组织样品的裂解：

本产品单次可处理  $\leq 20$ mg 动物组织。初次使用时，推荐起始动物组织量为 10mg。根据结果再调整用量。样品可用液氮研磨、机械/玻璃匀浆器、珠磨仪等工具进行匀浆。

#### 1. 称取小于 20mg 组织样品，选择合适的工具进行匀浆，加入 400 $\mu$ l RTL Lysis Buffer。

#### 2. 加入 200 $\mu$ l RNA Digestion Buffer 和 20 $\mu$ l Proteinase K，颠倒混匀 6-8 次，55℃温育 15 分钟。

#### 3. 室温下，14,000 $\times$ g 离心 5 分钟。按第 4 步进行操作。

## 过柱纯化 RNA

- 把 gDNA Filter Mini Column 装在 2ml 收集管中。把细胞裂解液或组织上清液转移至 gDNA 过滤柱中。14,000 × g 离心 2 分钟。
- 加入 0.5 倍体积或 1.5 倍体积的无水乙醇至滤液中。用移液枪吸打 5~10 次。  
若需获取 miRNA，加入 1.5 倍体积的无水乙醇至上清液中。
- 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 ≤750μl 混合液至柱子中。12,000 × g 离心 30~60 秒。
- (可选:混合液超过 750μl) 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余的混合液至柱子。12,000 × g 离心 30~60 秒。
- 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 300μl Buffer RWC 至柱子上。12,000 × g 离心 2 分钟，丢去滤液和柱子。
- 把 RNA 柱装在新的收集管中。按下表配制 DNase I 反应液，混匀。

成分	用量
DNase Buffer	100μl
DNase I(20Units/μl)	10μl

- 把全部的 DNase I 反应液滴加到柱子膜中央，盖上盖子，正放 5 分钟，然后再把柱子反放于桌面，让 DNase 反应液尽量覆盖于膜的表面（大部分的 DNA 在膜表面），室温静置 10~15 分钟消化去除 DNA。
- 加入 500μl Buffer RWC 至柱子上，静置 2 分钟。12,000 × g 离心 30~60 秒。
- 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500μl Buffer RW2 至柱子中，12,000 × g 离心 30~60 秒。
- 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 500μl Buffer RW2 至柱子中，12,000 × g 离心 30~60 秒。
- 倒弃流出液，把柱子装回收集管。12,000 × g 离心 2 分钟。
- 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 20~80μl RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。12,000 × g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于 -80°C。  
HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 20μl，若 RNA 产量超过 30μg，推荐进行第二次洗脱。本产品只回收 >200nt 的 RNA。小于 200nt 的 RNA(约占 15-20%)，包括 5S RNA 和 rRNA 等，在纯化过程中被去掉，可起到富集 mRNA 的作用。

当 RNA 总量高于 10 $\mu$ g 时, OD260/230 一般都在 1.3-2.2; 当 RNA 总量在 5~10 $\mu$ g 时, A260/230 会在 1.0~2.0; 当 RNA 总量低于 3 $\mu$ g, A260/230 会低于 1。这是因为 Buffer RTL 和 RV1 含异硫氰酸胍, 以及玻璃滤膜有吸水性或本底吸附。异硫氰酸胍在 230nm 有强烈吸光值, 因此 A260/230 主要受试剂中胍盐影响, 而不是来源于样品。研究表明, 低浓度异硫氰酸胍不影响反转录, 定量 RT-PCR, 二代测序等相关应用。出现 260/230 在 0.2-1.0 时, 可以忽略并直接用于反转录等下游应用。在不堵塞柱子的情况下, 适量提高样品用量和裂解液用量, 提高核酸浓度 (核酸总量>10 $\mu$ g) 时, OD260/230 可以明显改善。

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

- **样品用量太多:** 减少样品量, 超量的组织或细胞反而会降低产量和纯度。
- **样品富含肌纤维:** 肌肉、心脏、皮肤以及一些低等小型生物含肌纤维, 肌纤维分子量太大会引起柱子堵塞。建议使用 HiPure Fibrous RNA Kit。或订购 Proteinase K, 按 HiPure Fibrous RNA Kit 说明书进行抽提。
- **样品富含脂类物质:** 脑, 脂肪富含脂类物质, 推荐用 HiPure Universal RNA Kit。
- **富含多糖类样品:** 处理富含多糖的组织, 推荐用 HiPure Plant RNA Kit。
- **裂解液离心不充分:** 组织裂解液需高速离心去除杂质。细胞碎片会引起柱子的堵塞。处理某些样品时, 离心后裂解液表面还可能有一层脂类层, 转移上清液尽量不要吸到这些物质。
- **裂解液非常粘稠:** 加大裂解液用量, 并用一次性注射器抽打裂解液 5~10 次。

### 2. RNA 降解

- **RNase Free Water 被污染:** RNase Free Water 不含抑菌剂, 室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。更换新的 RNase Free Water 或 DEPC 处理水。
- **样品贮藏问题:** 反复解冻会引起 RNA 降解, 确保样品解冻次数不要超过 2 次。
- **裂解问题:** 样品在解冻前, 需要在 RTL lysis Buffer 中快速匀浆。样品只能充分裂解后, 内源的核酸酶才能被灭活, RNA 才不会降解。
- **电泳原因:** 常见的 RNA 降解现象都是电泳过程中引起的, 更换新的 Loading Buffer 和电泳缓冲液。

### 3. RNA 产量低

- **洗脱不充分:** RNase Free Water 需直接加到膜上, 并静置几分钟后再离心, 进行第二步洗脱以提高产量。
- **样品用量太多:** 减少样品用量, 超量的样品有时会引起产量下降。

